

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究（B） 一般

研究期間：2009～2012

課題番号：21380049

研究課題名（和文） 不良環境適応植物ヨシの有害金属動態と糖代謝の関係

研究課題名（英文） The relationship between allocation of toxic metals and carbohydrate metabolism in common reed adapted to abiotic stresses

研究代表者

樋口 恭子 (HIGUCHI KYOKO)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：60339091

研究成果の概要（和文）：ヨシはNa⁺や有害重金属が多い環境でも、それらの有害元素を植物体から効率的に排除、もしくは解毒して十分に生育することができる。ヨシは根に流入したNa⁺を地上部にほとんど輸送せず、根内で根先端に向かってNa⁺を輸送し、最終的に根外に排出していることを明らかにした。またそのNa⁺輸送に関わる可能性が高いイオン輸送体遺伝子を複数同定した。一方Cdに関して、ヨシは茎中のCdの約半分を、糖を主成分とした分子と結合させ、分子量1万から5万の高分子として安定に保持することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Common reed can grow under the excess toxic metal conditions, depending on effective exclusion of toxic metals or detoxification. We concluded that common reed have constitutive functions of efficient retrieval of Na⁺ from xylem vessel and efficient exclusion of Na⁺ only to the direction of root tips via phloem, and identified related ion-transporter genes. On the other hand, we have identified the association of Cd with an α -glucan-like molecule in the reed stem.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総計	11,400,000	3,420,000	14,820,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養・土壌学

キーワード：植物、ストレス、生理学、糖、放射線

1. 研究開始当初の背景

細胞壁と金属の相互作用や細胞壁による有害金属の隔離については研究例があるが、ほとんどグルコースのみからなる多糖である α グルカンと金属との、特に生体内における相互作用については我々のグループ以外に研究例が無い。植物体内の金属代謝・転流に対する糖、デンプンの意義はエネルギー源あるいは浸透圧調節しか考えられていなかった。ヨシがデンプン顆粒を蓄積するのはNaおよびCdストレスに対してのみであり、こ

のデンプンの蓄積は単なるストレス応答の代謝産物蓄積ではない。Cdに関しては可溶性 α グルカンがCdを結合・解毒していることが明らかであり、茎に蓄積するデンプン顆粒はその炭素源として機能すると思われる。本研究で得られる知見を一般植物においても検証すれば、植物体内における金属と α グルカンの相互作用という新しい研究分野を切り開くことが期待できる。加えて、極めて半減期の短い¹⁴C₂による炭酸同化産物の動態解析を金属動態解析と同一個体で行えば、

金属と炭水化物の輸送・代謝の相互作用をより定量的かつ生理的に意味のある条件で解析することが可能になる。この研究手法は植物栄養学に金属代謝と糖代謝のクロストークという新しい視点をもたらす。

本研究により α グルカンと金属の相互作用の具体的な機構が明らかになれば、塩害やCd蓄積の問題について植物の機能を応用した新たな対処方法を提案できるようになると考えられる。また有害金属結合能力の高い新素材を開発する手がかりを提供できる。

2. 研究の目的

我々は高い環境適応能力を持つヨシがNaとCdに対して特異的に新規 α グルカンを蓄積すること、および金属の蓄積部位と α グルカンの蓄積部位が一致することを見出した。本研究ではヨシの新規 α グルカンの構造、物理的・化学的性質を明らかにすると共に、金属ストレス下でのヨシの光合成産物の動態を非侵襲的分子イメージングと数理解析により明らかにする。これにより、ヨシが金属ストレスに対して、基幹的な生理である炭素代謝を変動させて応答する機構の全貌を明らかにする。植物体内における金属とグルカンの相互作用という新しい研究分野を切り開くと共に、NaやCdといった農業上の大きな問題に対処する新素材を発見することにつながる。

3. 研究の方法

(1) 有害金属の動態の解析

^{22}Na あるいは ^{107}Cd を根から吸収させ、PETISによる撮像データからそれら有害金属の蓄積部位・速度を算出する。

(2) ヨシのNa輸送体遺伝子の発現解析

マイクロダイセクションによりヨシ根を維管束・皮層・表皮に分け、HKT、CNGC、SOS1、NHX1のmRNA蓄積パターンをRT-PCRにより解析する。

(3) 新規 α グルカンの解析

限外ろ過法を用いて、Cd処理ヨシの茎汁液からCdと結合している高分子量画分を分取し、金属結合の特異性、金属結合条件、分子全体の構造に関する情報や金属と相互作用している官能基を調べる。

(4) 光合成産物動態の解析

NaやCdで処理したヨシに対して $^{14}\text{CO}_2$ を投与しPETISによる撮像データから炭素の蓄積部位・速度を算出する。最新展開葉の光合成速度を測定する。

(5) デンプン合成・分解酵素の発現解析

AGPaseおよびアミラーゼのmRNA蓄積量・タ

ンパク質蓄積量・酵素活性を、デンプン蓄積量と共に、NaやCdのストレス開始後に経日的に測定する。

4. 研究成果

(1) 有害金属の動態の解析

^{22}Na 、 ^{107}Cd とも、ヨシでは葉には全く移行しないことが分かった。パルス・チェイス実験により、 ^{22}Na はヨシ根に吸収された後、根先端に向かって移動するが地上部へは全く移動しないことが分かった。これに対し、イネの場合は根から吸収された ^{22}Na が長時間にわたって地上部に移動し続けることが分かった（投稿準備中）。

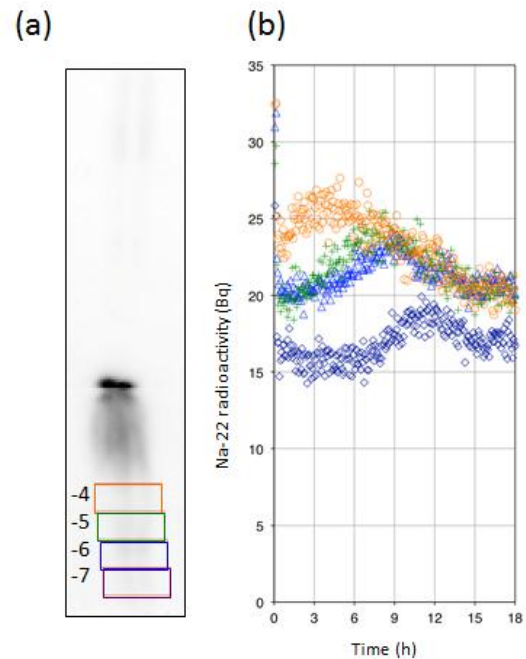


図1 ヨシ根におけるNaの移動

^{22}Na を吸収させた後、放射活性の無いNaで栽培を続けながらPETISで24時間撮像を続けた。(a)には根の領域を4つ示し、その領域の放射活性の経時的な変化を(b)に示した。放射活性のピークが時間と共に根の下方に移動しているのが分かる。

(2) ヨシのNa輸送体遺伝子の発現解析

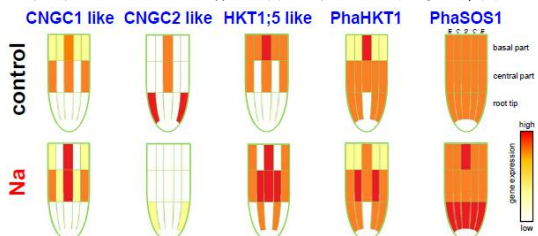


図2 ヨシ根のNa輸送体遺伝子の発現色の濃い部分はその輸送体遺伝子の発現量が多いことを示す。

マイクロダイセクションによりヨシ根を維管束・皮層・表皮に分け、HKT、CNGC、SOS1、

NHX1 の mRNA の蓄積を RT-PCR により検出したところ、Na 処理による発現量の増減が見られた。根端において、CNGC2 の発現低下は Na の流入抑制に貢献し、PhaSOS1 の発現上昇は Na の排出に貢献すると考えられる。根中央部・基部における CNGC1、HKT1;5 の発現上昇は維管束における Na の回収に貢献すると考えられる。

(3) 新規 α グルカンの解析

ヨシ茎で可溶性 Cd を結合している分子量 1 万～5 万の分子は、Cd 誘導的に茎に蓄積すること、Cd の他に Cu と Fe も結合すること、 α アミラーゼにより部分的に分解されること、アルカリ性では Cd との結合は安定だが pH 2 以下の酸性では低分子画分に移行し Cd を添加しつつ中性に戻すと再度 Cd は高分子量画分から検出されること、適切な S-S 結合が Cd の保持に必要であること、Cd との結合にリン酸基は関与していないことが分かった。このような分子はこれまでに報告がない。(論文①)

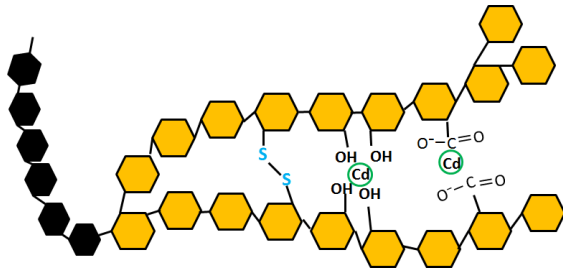


図3 予想される Cd 結合物質の構造

(4) 光合成産物動態の解析

最新展開葉の光合成速度は Na 処理や Cd 処理により若干低下したが、十分な光合成速度を維持していた。Na 処理したヨシでは $^{14}\text{CO}_2$ の分配は対照区と同様であったが、Cd 処理したヨシでは茎と根により多くの $^{14}\text{CO}_2$ が分配されるようになった。これはヨシ茎で糖を主成分とする分子が Cd を結合していること、根で Cd の解毒を行うために多くのエネルギーを必要としていることに対応すると考えられる。

(5) デンプン合成・分解酵素の発現解析

ヨシでは Cd 処理により、葉・茎・根の全体でデンプン蓄積量が上昇したが、特に茎へのデンプン蓄積割合が増加した。これは(4)で茎への同化炭素の分配割合が増加したことと一致する。また Cd 処理により、デンプン合成の律速段階である AGPase の活性が上昇するとともに、デンプンを分解する α アミラーゼの活性も上昇した。したがって、ヨシは Cd ストレスにさらされると茎にデンプンを蓄積しそれを分解して Cd を結合する分子を合成している可能性が考えられる。

(6) 総括

ヨシは体内に侵入した有害金属を効率的に排出あるいは解毒するために代謝系や物質輸送系を適応させているが、その分子機構の一端が明らかになった。今後はこれらの制御系を明らかにすることにより、不良環境においても生産性の高い作物の育成を目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Kyoko Higuchi, Masahisa Tsuchiya, Suzuka Nakata, Ami Tanabe, Sayaka Fukawa, Masatake Kanail, Eitaro Miwa. Detoxification of Cd by a novel, cadmium (Cd)-associated molecule induced by Cd in the stem of common reed. Journal of Plant Physiology, 査読あり 2013 年 印刷中

[学会発表] (計 8 件)

① 佐藤毅治、三輪睿太郎、樋口恭子「ヨシ根におけるイオン輸送体様遺伝子の局所発現解析」平成 25 年 3 月 日本植物生理学会大会

② Kyoko Higuchi, Takeharu Sato, Nobuo Suzui, Teppei Maruyama, Shu Fujimaki, Eitaro Miwa. Sodium transport and ion transporter gene expressions in the root of common reed (*Phragmites australis*). 平成 25 年 3 月 (日本) 16th International Workshop on Plant Membrane Biology

③ 藤巻秀、丸山哲平、鈴木伸郎、三輪睿太郎、樋口恭子「ヨシはナトリウムを根内で回収し篩管を通じて排出する -Na-22 とポジトロンイメージング技術を用いた解析」平成 24 年 9 月 日本土壌肥料学会大会

④ 樋口恭子、土屋将久、鈴木伸郎、三輪睿太郎、藤巻秀「ヨシの炭酸同化産物分配に対する Cd の影響とヨシ茎に蓄積する新規 Cd 結合物質」平成 24 年 9 月 日本土壌肥料学会年会

⑤ 土屋将久、府川さやか、三輪睿太郎、樋口恭子「ヨシ茎における 10-50 kDa カドミウム結合物質の基本骨格の検討」平成 24 年 3 月 日本植物生理学会年会

⑥ 土屋将久、府川さやか、鈴木伸郎、石井里美、河池有木、藤巻秀、三輪睿太郎、樋口恭子「ヨシ茎における炭水化物を主成分とする 10-50 kDa カドミウム結合物質の解明」平成 23 年 8 月 日本土壌肥料学会年会

⑦ 府川さやか、三輪睿太郎、樋口恭子「ヨシ茎における新規カドミウム結合物質の特徴と SH 基の役割」平成 22 年 3 月 日本植物生理学会年会

- ⑧府川さやか、三輪睿太郎、樋口恭子、「ヨシ茎における新規カドミウム結合物質の構造の推定」平成21年9月 日本土壤肥料学会年会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 恭子 (HIGUCHI KYOKO)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：60339091

(2) 研究分担者

藤田 直子 (FUJITA NAOKO)
秋田県立大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：90315599
鈴木 伸郎 (SUZUI NOBUO)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・
量子ビーム応用研究部門・研究員
研究者番号：20391287

(3) 連携研究者

河地 有木 (KAWACHI YUUKI)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・
量子ビーム応用研究部門・研究員
研究者番号：70414521
藤巻 秀 (FUZIMAKI SYU)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・
量子ビーム応用研究部門・研究員
研究者番号：20354962
石井 里美 (ISII SATOMI)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・
量子ビーム応用研究部門・研究員
研究者番号：10391286